

23/5/2
DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012976397

WPI Acc No: 2000-148246/200014

XRAM Acc No: C00-046607

Express and purification of human serum albumin in Pichia pasters -
comprises the construction of recombined expression plasmid PPKQ-HSA
(Human serum albumin)

Patent Assignee: SHANGHAI INST BIOCHEMISTRY CHINESE ACAD (SHAN-N)

Inventor: QIU R; WU X; YUAN Z

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
CN 1235981	A	19991124	CN 98110844	A	19980515	200014 B

Priority Applications (No Type Date): CN 98110844 A 19980515

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
CN 1235981	A	1	C07K-014/765	

Abstract (Basic): CN 1235981 A

The expression and purification method for human serum albumin in Pichia pasters of the present invention features the construction of recombined expression plasmid PPKQ-HSA and the high-efficiency separation and purification of expressed HSA. The method can obtain sample purity higher than 99%.

Dwg.0

Title Terms: EXPRESS; PURIFICATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; PICHIA; COMPRISE
; CONSTRUCTION; RECOMBINATION; EXPRESS; PLASMID; HUMAN; SERUM; ALBUMIN

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-014/765

International Patent Class (Additional): C12N-001/19

File Segment: CPI

BEST AVAILABLE COPY

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/765

C12N 1/19

//C12N1/19, C12R1:

84

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98110844.X

[43]公开日 1999年11月24日

[11]公开号 CN 1235981A

[22]申请日 98.5.15 [21]申请号 98110844.X

[71]申请人 中国科学院上海生物化学研究所

地址 200031 上海市岳阳路320号

共同申请人 上海第一生化药业公司

[72]发明人 袁中一 邱荣德 吴祥甫

李士云 夏其昌 储瑞藻

[74]专利代理机构 上海医药专利事务所

代理人 王 巍

权利要求书3页 说明书8页 附图页数6页

[54]发明名称 人血清白蛋白在毕赤酵母中的表达与纯化

[57]摘要

本发明涉及一种人血清白蛋白在毕赤氏酵母(*Pichia pastors*)中的表达与纯化方法。本发明的方法特征在于重组表达质粒 pPKQ-HSA 的构建和表达 HSA 的高效分离纯化。用该方法获得的样品纯度高于99%。

ISSN 1008-4274

98.05.27

说明书附图

1: ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TOC CTT CTT TTT CTC TTT ACC TGG
met lys trp val thr phe ile ser leu leu phe leu phe ser ser
-20 -15 -10

16: OCT TAT TOC AGG GGT GTG TTT CGT CGA GAT GCA CAC AAG AGT GAG
ala tyr ser arg gly val phe arg arg asp ala his lys ser glu
-5 1

31: GTT GCT CAT CCG TTT AAA GAT TIG CGA GAA GAA AAT TTC AAA GCG
val ala his arg phe lys asp leu gly glu glu asn phe lys ala

46: TTG GTG TTG ATT GCG TTT CGT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT
leu val leu ile ala phe ala gln tyr leu gln gln cys pro phe

61: GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT CCA AAA
glu asp his val lys leu val asn glu val thr glu phe ala lys

76: ACA TGT GTT GCT GAT GAA TCA CGT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT
thr cys val ala asp glu ser ala glu asn cys asp lys ser leu

91: CAT ACC CTT TTT CGA GAC AAA TTA TOC ACA GTT GCA ACT CTT CGT
his thr leu phe gly asp lys leu cys thr val ala thr leu arg

106: GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TOC TGT CCA AAA CAA GAA CGT
glu thr tyr gly glu met ala asp cys cys ala lys gln glu pro

121: GAG AGA AAT GAA TOC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC
glu arg asn glu cys phe leu gln his lys asp asp asn pro asn

136: CTC GCG CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TOC ACT GCT
leu pro arg leu val arg pro glu val asp val met cys thr ala

151: TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA
phe his asp asn glu glu thr phe leu lys lys tyr leu tyr glu

166: ATT GCG AGA AGA CAT CGT TAC TTT TAT GCG GCG GAA CTC CTT TTC
ile ala arg arg his pro tyr phe tyr ala pro glu leu leu phe

图 1

权 利 要 求 书

1、一种高表达人血清白蛋白的巴斯德毕赤酵母重组细胞的构建表达和纯化方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

一、人血清白蛋白 cDNA 的获得：

(1)人胚肝细胞总 RNA 的抽提

按照 Trizol RNA 抽提试剂盒推荐方法，从中国人胚肝细胞中抽提总 RNA；

(2)pre-HSA cDNA 合成和 PCR 体外扩增

根据已知天然 HSA 基因 5'和 3'端序列，设计引物：

引物 1：5'CGGAATTCTTATAAGCCTAAGGCAGC 3'

引物 2：5'CGGGATCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCC 3'
以抽取的人肝白细胞总 RNA 为模板，反转录合成人血清白蛋白 pre-HSA cDNA，

(3)所构建的基因 5'端 BamHI 位点与 ATG 之间插入了一段 Kozak 序列 5'CCACC3'，3'端紧接基因的终止密码含一 EcoRIa 位点。

二、HSA 在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的表达

(1)重组表达质粒 pPKQ-HSA 的构建：

将 PUC19-HSA 克隆载体中 pre-HSA 基因片段用 BamHI 和 EcoRI 双酶切下，1%琼脂糖电泳分离，并用酚/氯仿回收。将约 2Kb 的 pre-HSA 基因回收片段与用相同酶切的 pPIC3.5K 表达载体连接，转化 *E.coli* TG1 感受态细胞，涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定出重组质粒 pPKQ-HSA。

(2)表达质粒 pPIC9-HSA 和 pPIC9k-HSA 的构建

设计引物：

引物 3：

5'CGCTCGAAAAGGGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAA 3'

用引物 3 和引物 1 从 PUC19-HSA 上 PCR 扩增 HSA cDNA 片段，酚/氯仿抽提 PCR 产物后，用 XhoI 和 EcoRI 酶切回收。再与用相同酶切的 pPIC9 质粒连接，转化 *E.coli* TG1 感受态细胞。涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 XhoI 和 EcoRI 双酶切初步鉴定重组质粒 pPIC9-HSA，

取 4 个经 XhoI 和 EcoRI 双酶切初步鉴定的重组克隆，制备高纯度质粒 DNA，采用 5'AOX1 primer 和 3'AOX1 primer (Invitrogen)，测定重组质粒 HSA cDNA 两端序列。结果有三个含完全正确的阅读框。经测序验证的 pPIC9-HSA 质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切并回收含 HSA 基因片段，与相同酶切的 pPIC9-HSA 质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切并回收含 HSA 基因片段，与用相同酶切的 pPIC9k 质粒连接，转

碱裂解法制备质粒 DNA，所得质粒 DNA 用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切鉴定得重组质粒 pPIC9k-HSA。

(3) 重组质粒 pPKQ-HSA 转化毕赤酵母细胞 GS115(his4Mut⁻)

将构建的重组表达质粒 pPKQ-HSA 和 pPIC9k-HSA 用 *Sa*II 或 *Bgl*II 酶切线性化。同时将空载 pPIC3.5k 和 pPIC9k 质粒相同酶切线性化，酚/氯仿抽提回收并溶解于无菌水中。按照 Invitrogen, Pichia Expression Kit Instruction Manual (Version E) 方法电转化 GS115 细胞，涂布含不同浓度 G418 的 YPD 平板，获得不同 G418 抗性的阳性克隆，经 MD 平板验证 his⁺ 表型获得 GS115/HSA 重组克隆 S1B119。

(4) 重组克隆 *pichia pastoris* GS115/HSA S1B119 株细胞的表达

将筛选出的 GS115/HSA 重组细胞接种 3ml YPD 试管，30℃ 300rpm 培养过夜，再以 0.2% - 0.5% 接种量接种 50ml BMGY, 30℃、300rpm 培养至 OD₆₀₀ 4~7。离心收集菌体悬于 15ml 含甲醇的 BMMY 培养液中，置 20-30℃ 摇床诱导培养，每 24hr 加甲醇到 0.5ml/L。定时取样，经 4℃ 离心，上清加入 PMSF 至 1mM，-20℃ 冻存；

三、表达 HSA 的分离纯化

(1) 中空纤维柱

将 2L 低密度诱导发酵液除细胞后用截留分子量 10KDa-50KDa 的中空纤维柱除去低于 50KDa 的杂质并使浓缩到 0.2L 浓缩液。HSA 收率为 95%；

(2) 脱色浓缩发酵液经 50℃ 保温后，加入 3% 活性炭或 732 等脱色树脂处理 10 分钟后离心除去，得脱色浓缩液；

(3) pharose 疏水柱分离

浓缩发酵液或脱色浓缩液中加入固体 (NH₄)₂SO₄ 至 20% 并流过 (NH₄)₂SO₄ 平衡的 Phenyl-Sepharose 柱，上样后用平衡液洗涤至流出液 OD₂₈₀ < 0.01 后改用水洗脱，收集用水洗脱的 HSA 蛋白，收率为 95%；

(4) 亲和层析除杂蛋白

① 无 HSA 发酵液抗血清 - Sepharose 制备：由 1 所得浓缩发酵液经抗 HSA 抗体 - Sepharose 除去 HSA。流出液为无 HSA 发酵液，按发明人论文[徐俊等，生物工程学报 1993, 9(1) 69-73]方法将无 HSA 发酵液制得的抗血清，通过醛基结合于 Sepharose；

② 疏水层析纯化得到的水洗脱峰通过“无 HSA 发酵液的抗血清”亲和柱，收集未吸附的蛋白峰为 HSA，回收率 > 98%；

(5) 超滤脱盐

将亲和层析漏出蛋白峰经截留分子量 10KDa 中空纤维或超滤膜组件中脱盐。可得纯度 > 99% 的 HSA，回收率 > 98%；

98.05.27

(6)真空冷冻干燥

将脱盐后的 HSA 溶液真空冷冻干燥得到 HSA 样品。

2、一种用于权利要求 1 所述方法的菌种 CGMCC No 0349。

人血清白蛋白在毕赤酵母中的表达与纯化

本发明涉及基因工程药物，具体涉及高表达人血清白蛋白的巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）重组细胞的构建、表达和高度纯化。

人血清白蛋白（Human Serum Albumin, HSA）是血浆中最重要的蛋白质成分之一，其含量约占血浆总蛋白的 60%，具有维持血液渗透压和携带血液中多种配基（包括脂肪酸、氨基酸、类固醇、金属离子及药物）与组织进行交换等生理功能。临床医疗中用于手术输血和危重病人补液，治疗创伤烧伤休克、发烧、水肿和大出血，又能增强人体抵抗能力，是重要的临床药物。但由于人血来源有限，又因爱滋病及肝炎的蔓延及检测与技术的原因，对 HSA 药物的制备提出了更高的要求，如何用基因重组细胞制备 HSA 取代人血源 HSA，阻止爱滋病、肝炎病毒的传染成为众所瞩目的研究方向。

八十年代以来，国际上许多公司尝试通过基因工程开发 HSA，HSA 基因已被引入细菌、酵母、放线菌、植物以及动物进行表达。

（Goodey, A.R., TIBTECH 1993, 8(11):430-433）大肠杆菌表达 HSA 的量为细胞蛋白的 7%，但大分子 HSA 含有大量二硫键，使体外折叠极难完成，未能得到有生物功能的蛋白，细菌细胞壁脂多糖造成热源反应，结果不很理想。HSA 在面包酵母和工业酵母中的表达量为 1% 细胞总蛋白，为胞内表达，虽无热源物质，但 LAL（*Limulus Amoebocyte Lysate*）检验不合格。在众多努力中发现 HSA 基因在巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）的表达为细胞外分泌型，人们在努力寻求高效表达及高度纯化 [Prevatt, W.D. et al., 1994 US Pat. 5330901 Ohmura, T. et al., 1995, US Pat. 5440018 Ohda, T. et al., 1997 US Pat. 5612197 Sreekrishna, K. et al. 1998, US Pat. 5707828] 鉴于 HSA 需求量极大，纯度要求极高，更高表达量的重组细胞的构建和高效、简单、大规模易工业化的纯化工艺极为必要。

本发明的目的在于克服上述不足，运用所构建的巴斯德毕赤酵母重组细胞进行高水平的外分泌表达 HSA，运用所建立的高效分离纯化工艺获得高纯度的 HSA。

本发明所用材料及来源：

DNA 合成试剂盒、Klenow 片段多聚酶和所有使用的内切酶均为 GIBCO BRL 公司产品。pPIC9、*Pichia pastoris* GS115(his4 Mut⁺) 为 Invitrogen 公司产品，DNA 序列测定试剂盒和 Trizol RNA 抽提试剂盒购自 Promega 公司，YNB（W/O amino acid）购自 DIFCO 公司。

本发明提供了一种高表达人血清白蛋白的巴斯德毕赤酵母重组细胞的构建、表达和高效纯化方法，该方法包括下列步骤：

一、中国人血清白蛋白 cDNA 的获得:

1、人肝白细胞总 RNA 的抽提

按照 Trizol RNA 抽提试剂盒推荐方法,从中国人胚肝细胞中抽提总 RNA;

2、pre-HSA cDNA 合成和 PCR 体外扩增

根据已知天然 HSA 基因 5'和 3'端序列,设计引物:

引物 1: 5'CGGAATTCTTATAAGCCTAAGGCAGC 3'

引物 2: 5'CGGGATCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCC 3'

以抽取的人肝白细胞总 RNA 为模板,按照 DNA 合成试剂盒推荐的方法,通过引物 1 和引物 2 反转录合成人血清白蛋白 pre-HSA cDNA.

3、PCR 合成 pre-HSA cDNA 的序列验证

按照 klenow 聚合酶推荐使用方法,将回收的 PCR 产物用 klenow 片段聚合酶补平。酚/氯仿回收补平产物。将补平的 PCR 产物与 *Sma*I 酶切的 PUC19 载体平端连接,所得连接产物转化 *E.coli* TG1 感受态细胞,涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA,所得质粒 DNA 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切初步鉴定出重组质粒 PUC19-HSA。然后使用 PUC19 载体上引物-W40 和 W1,测定 pre-HSA 两端序列。再根据已知正确序列设计引物测定剩余部分序列,最后得到一个序列与天然 HSA 基因基本一致的克隆。序列的部分核苷酸有改变,但氨基酸序列与天然 HSA 完全一致。pre-HSA 核酸及蛋白序列见图 1 (pre-HSA 核酸及蛋白序列)。

4、所构建基因 5'端含一 *Bam*HI 位点, *Bam*HI 位点与 ATG 之间含一 Kozak 序列 5'-CCACC-3',见图 2 (构建 pre-HSA cDNA 5'端 Kozak 序列)。3'端紧接终止密码子含一 *Eco*RI 位点,参见图 3 (构建 pre-HSA cDNA 3'端序列)。

二、HSA 在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的表达

1、重组表达质粒 pPKQ-HSA 的构建:

将 PUC19-HSA 克隆载体中 pre-HSA 基因片段用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切下,1%琼脂糖电泳分离,并用酚/氯仿回收。将约 2Kb 的 pre-HSA 基因回收片段,与用相同酶切的 pPIC3.5K 表达载体连接,转化 *E.coli* TG1 感受态细胞,涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定出重组质粒 pPKQ-HSA。

2、表达质粒 pPIC9-HSA 和 pPIC9k-HSA 的构建

设计引物 3:

5' CGCTCGAAAAGGGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAA 3'

用引物 3 和引物 1 从 PUC19-HSA 上 PCR 扩增 HSA cDNA 片段,酚

/氯仿抽提 PCR 产物后, 用 *XhoI* 和 *EcoRI* 酶切回收。再与用相同酶切的 pPIC9 质粒连接, 转化 *E.coli* TG1 感受态细胞。涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切初步鉴定重组质粒 pPIC9-HSA,

取 4 个经 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切初步鉴定的重组克隆, 制备高纯度质粒 DNA, 采用 5' AOX1 primer 和 3' AOX1 primer (Invitrogen), 测定重组质粒 HSA cDNA 两端序列。结果有三个含完全正确的阅读框。经测序验证的 pPIC9-HSA 质粒用 *BamHI* 和 *EcoRI* 酶切并回收含 HSA 基因片段, 与用相同酶切的 pPIC9k 质粒连接, 转化 *E.coli* TG1 感受态细胞, 涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA, 所得质粒 DNA 用 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定得重组质粒 pPIC9k-HSA。

3、重组质粒 pPKQ-HSA 转化毕赤酵母细胞 GS115(his4Mut⁻)

毕赤酵母表达载体 pPKQ-HSA 和 pPIC9k-HSA 分别由 pPIC3.5K 和 pPIC9K 衍生而来, 内含 G418 抗性基因, 为多基因拷贝载体, 可以在同一酵母细胞中整合多个基因拷贝, 从而提高蛋白的表达量。同一转化细胞中整合基因的拷贝数与转化细胞对 G418 的抗性成比例。因此可以通过 G418 抗性筛选出不同基因拷贝数的重组细胞, 获得高表达的重组菌株。将构建的重组表达质粒 pPKQ-HSA 和 pPIC9k-HSA 用 *SaI* 或 *BglII* 酶切线性化。同时将空载 pPIC3.5k 和 pPIC9k 质粒相同酶切线性化, 酚/氯仿抽提回收并溶解于无菌水中。按照 Invitrogen, Pichia Expression Kit Instruction Manual (Version E) 方法电转化 GS115 细胞, 涂布含不同浓度 G418 的 YPD 平板, 获得不同 G418 抗性的阳性克隆, 经 MD 平板验证 his⁺表型获得 GS115/HSA 重组克隆 S1B119。

4、重组克隆 *Pichia pastoris* GS115/HSA-S1B119 株细胞的表达

将筛选出的 GS115/HSA 重组细胞接种 3ml YPD 试管, 30 °C 300rpm 培养过夜, 再以 0.2% ~ 0.5% 接种量接种 50ml BMGY, 30 °C, 300rpm 培养至 OD₆₀₀ 4~7。离心收集菌体悬于 15ml 含甲醇的 BMMY 培养液中, 置 20-30 °C 摇床诱导培养, 每 24hr 加甲醇至 0.5ml/L。定时取样, 经 4 °C 离心, 上清加入 PMSF 至 1mM, -20 °C 冻存。20ml 上清液经 10 % SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 结果显示分子量 67KDa 部位有明显条带, 如图 4。(SDS-PAGE 分析 HSA 的表达)。(I: 24hr 发酵液, II: 48hr 发酵液, III: LMW 蛋白标准) Western-blot 分析证明其抗 HSA 抗体的免疫活性。火箭电泳测定上清液中 HSA 含量, 如图 5。(火箭电泳测定 HSA 含量)(I: 标准 HSA < 500ug/ml, II: 标准 HSA 300ug/ml, III: 标准 HSA 100ug/ml, IV: 标准 HSA 50ug/ml, V-VII: 48hr 发酵液)。HSA 分泌曲线如图 6。(低密度诱导 HSA 分泌

曲线)。诱导 2 天发酵液中 HSA 含量可达约 140mg/L。通过改变 BMMY 中诱导的菌体浓度,发现随菌体浓度的增加, HSA 分泌量几乎线性地增加(图 7.菌体浓度对 HSA 诱导的影响)。表明经过自动发酵罐中高密度诱导可获更高表达量。

三、表达 HSA 的分离纯化

HSA 的分离纯化已有较多报道,但大多较为繁琐[U.S. Pat. 5440018, US Pat. 5369020]。我们发现重组巴斯德毕赤酵母细胞所表达的产物溶液中杂质较少,主要为一些毒素和色素。本发明主要采用膜分离技术,亲和层析技术结合其他方法除去杂质以高产率地获得高纯度 HSA。

HSA 分离纯化流程:

1、中空纤维柱

2L 低密度诱导发酵液除去细胞后,用截留分子量 10KDa-50KDa 的中空纤维柱除去低于 50KDa 的杂质并使浓缩到 0.2L 浓缩液。HSA 收率 $\geq 95\%$;

2、脱色

浓缩发酵液经 50℃保温后,加入 3% 活性炭或 732 等脱色树脂处理 10 分钟后离心除去,得脱色浓缩液;

3、疏水柱分离

浓缩发酵液或脱色浓缩液中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 直至达 20% 终浓度,并流过 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 平衡的 Phenyl-Sepharose 柱,上样后用平衡液洗涤至流出液 $\text{OD}_{280} < 0.01$,再改用水洗脱。收集用水洗脱的 HSA 蛋白,收率 $\geq 95\%$;

4、亲和层析除去杂蛋白

(1)无 HSA 发酵液抗血清 - Sepharose 的制备:由 1、所得浓缩发酵液流经抗 HSA 抗体 - Sepharose 以除去 HSA。流出液为无 HSA 发酵液,按发明人论文[徐俊等,生物工程学报 1993,9(1)69-73]方法将无 HSA 发酵液制得的抗血清通过醛基结合于 Sepharose 上;

(2)将疏水层析纯化得到的水洗脱峰通过“无 HSA 发酵液的抗血清”亲和柱,直接流过的蛋白峰即为 HSA,回收率 $\geq 98\%$;

5、超滤脱盐

将亲和层析流出蛋白峰经截留分子量 10KDa 中空纤维或超滤膜组件中脱盐。可得纯度 $\geq 99\%$ 的 HSA,回收率 $\geq 98\%$;

6、真空冷冻干燥

脱盐后的 HSA 溶液真空冷冻干燥得到 HSA 样品。

按本发明方法制得的 HSA 经 10% SDS - PAGE 凝胶电泳,银染显色扫描分析表明,纯度高于 99%,并且验证不含色素,见图 8。(SDS-PAGE 分析纯化的 HSA)。

本发明的另一目的是提供了一种用于上述方法的菌株 GS115/HSA-SIB119，该菌种属巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*，已于 1998 年 5 月 5 日藏于“中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心”，保藏编号为 CGMCC No 0349。

实施例 1 pre-HSA cDNA 的获得

取 2 克人胚肝细胞，按照 Trizol RNA 抽提试剂盒推荐方法，从人胚肝细胞中抽提总 RNA。根据已知天然 HSA 基因 5' 和 3' 端序列，设计引物 (Primer) 如下：

引物 1: 5' CGGAATTCTTATAAGCCTAAGGCAGC 3'

引物 2: 5' CGGGATCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCC 3'

以抽提的人胚肝细胞总 RNA 为模板，PCR 反转录合成血清白蛋白 pre-HSA cDNA。PCR 反应体系参照文献 (Scharf S. J., In PCR protocol: A Guide to Method and Application, 2nd ed. New York, Academic Press, USA 1990) 进行。反应条件为：

94 °C 变性 45 秒，

55 °C 退火 1 分钟，

72 °C 延伸 1 分 30 秒，

共 40 个循环，最后 72 °C 保温 10 分钟。PCR 产物经 1 % 琼脂糖电泳初步确证后，酚/氯仿抽提回收。得 5' 端为 *Bam*HI，3' 端为 *Eco*RI 的 PCR 产物。

按照 klenow 多聚酶推荐使用方法，将回收的 PCR 产物用 klenow 片段聚合酶补平。酚/氯仿回收补平产物。将补平的 PCR 产物与 *Sma*I 酶切的 PUC19 载体平端连接，连接反应体系如下：

PUC19 (<i>Sma</i> I 切)	1ul
5 × 连接缓冲液	3ul
T4 DNA 连接酶 (1u/ul)	1.5ul
<i>Sma</i> I (1u/ul)	0.5ul
PCR 补平产物	5ul
H ₂ O	4ul

以上混合物 21 °C 连接 5 小时。所得连接产物转化 *E. coli* TG1 感受态细胞，涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切初步鉴定出重组质粒 PUC19-HSA。

实施例 2 表达质粒 pPKQ-HSA 的构建

将 PUC19-HSA 克隆载体中 pre-HSA 基因片段用 *Bam*HI 和 *Eco*RI

双酶切下，1%琼脂糖电泳，酚/氯仿回收约2Kb的 pre-HSA 基因片段。回收片段与用相同酶切的 pPIC3.5K 表达载体连接，连接反应如下：

pPIC3.5K (<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI 切)	1ul
5 × 连接缓冲液	3ul
T4 DNA 连接酶 (1u/ul)	1.5ul
pre-HSA	3ul
H ₂ O	6.5ul

以上混合物 21℃ 连接 5 小时。所得连接产物转化 *E. coli* TG1 感受态细胞，涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切鉴定得重组质粒 pPKQ-HSA。

实施例 3 表达质粒 pPIC9K-HSA 的构建

设计引物如下：

引物 3：5' CGCTCGAGAAAAGGGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAA 3'

用引物 3 和引物 1（见实施例 1）从 PUC19-HSA 上 PCR 扩增 HSA cDNA 片段，扩增条件如同实例 1。酚/氯仿抽提回收 PCR 产物，用 *Xho*I 和 *Eco*RI 酶切回收，与相同酶切的 pPIC9 质粒连接，连接条件同实例 2。连接产物转化 *E. coli* TG1 感受态细胞，涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切初步鉴定重组质粒 pPIC9-HSA。

取 4 个经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切初步鉴定的重组克隆。碱裂解法制备质粒 DNA，采用 5'AOX1 primer 和 3'AOX1 primer（Invitrogen），测定重组质粒 HSA cDNA 两端序列。测序方法按照 Promega 测序试剂盒推荐方法。结果有三个含完全正确的阅读框。将测序验证的 pPIC9-HSA 质粒用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切并回收含 HSA 基因片段，与用相同酶切的 pPIC9K 质粒连接，转化 *E. coli* TG1 感受态细胞，涂布氨苄青霉素板筛选阳性克隆。采用碱裂解法制备质粒 DNA。所得质粒 DNA 用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切鉴定得重组质粒 pPIC9K-HSA。

实施例 4 表达质粒转化毕赤酵母 GS115

将构建的重组表达质粒 pPKQ-HSA 和 pPIC9K-HSA 分别用 *Sa*I 或 *Bg*III 酶切线性化，同时将空载 pPIC3.5K 和 pPIC9K 质粒相同酶切线性化。酚/氯仿抽提回收并溶解于无菌水中。按 Invitrogen 手册介绍的方法（Invitrogen, Pichia Expression Kit Instruction

Manual<Version E>) 制备 GS115 电转化细胞。将上述约 5 μ g 线性化 DNA 分别与 80 μ l GS115 电转化细胞混合, 采用 Bio-Rad 电转化仪电击转化, 电转化条件为: 电压 1500V, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω 。电转化产物分别转移到一无菌微量离心管中, 立即加入 0.50ml $^{\circ}$ C 预冷 1mol/L 山梨醇, 30 $^{\circ}$ C 静置一小时, 加入 0.5ml YPD (10 g/L 酵母膏, 20 g/L 蛋白胨, 20g/L 葡萄糖) 后 30 $^{\circ}$ C 保温过夜。第二天快速离心去除上清, 加入 300 μ l 无菌水悬浮菌体。各取 100 μ l 涂布含不同浓度 G418 的 YPD 平板 (含 G418 各 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 1.5mg/ml), 30 $^{\circ}$ C 3 ~ 4 天后将阳性克隆点接 MD 平板验证 his⁺表型, 30 $^{\circ}$ C 2 天后的阳性克隆即为 *Pichia pastoris* GS115/HSA 重组克隆, 其中含 G418 浓度高的 YPD 平板上的阳性克隆整合入 HSA 基因的拷贝数也高。

实施例 5 HSA 在毕赤酵母中的表达

将筛选出的 GS115/HSA 重组克隆 S1B119 细胞接种 3 ml YPD 试管, 30 $^{\circ}$ C 300 r/min 摇床中培养过夜, 以 0.2 % 接种量加入含 50ml BMGY (10 g/L 酵母膏, 20 g/L 蛋白胨, 0.1 M 磷酸钾缓冲液 pH6.0, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 10 g/L 甘油) 的 250 ml 培养瓶中。30 $^{\circ}$ C 300 rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 4~5。常温 5000 rpm 离心 4 min。收集的菌体用 15 ml BMMY (将 BMGY 中 10 g/L 甘油改变为 5 ml/L 甲醇) 悬浮后转移到 150ml 三角瓶, 28 $^{\circ}$ C 300 rpm 开始诱导。每 24 小时补加甲醇到 5 ml/L。并在 12、24、36、48、96 小时取样。4 $^{\circ}$ C 15000 rpm 离心 10 min 后, 上清立即加入 PMSF 至 1mM, 放 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

实施例 6 表达 HSA 的分离纯化

1、抗 HSA 抗血清的获得 用 1mg/ml 的 HSA (Sigma) 与福氏完全佐剂乳化剂皮下多点注射免疫成熟雄兔。以后每 3 周用 1mg/ml 的 HSA 与福氏不完全佐剂乳化剂加强免疫。共 3 次加强免疫后采血, 分离上清并用 38 % 饱和度硫酸铵沉淀抗血清。

2、抗 HSA-Sepharose 4B 亲和柱制备 按文献 (徐俊, 祁俊, 袁中一. 生物工程学报, 1993, 9 (1): 69-73) 制备醛基-Sepharose 4B 载体。将获得的兔抗 HSA 抗血清用 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液透析后, 用透析液稀释到约 10 OD₂₈₀/ml。在 40g 抽干的醛基-Sepharose 4B 载体中加入 80ml 抗 HSA 抗血清中, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱搅拌过夜。凝胶用 0.5mol/L NaCl 洗涤 3 次后抽干, 抗 HSA-Sepharose 再置于 160ml 含 3.1mg/ml 氰基硼氢化钠的 1mol/L pH7.4 Tris-HCl 缓

冲液中，室温反应一小时。然后用大量水洗去未反应的氰基硼氢化钠。所得免疫吸附剂抽干浸泡于 0.02 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液（含 0.9%氯化钠）备用。

3、表达 rHSA 的火箭电泳测定方法 以 2%含兔抗 HSA 抗血清的琼脂糖形成电泳凝胶，点样不同浓度标准 HSA 样品（50-500ug/ml）和待测样品各 5ul，120V 电泳 2 - 3 小时至沉淀峰明显。测量沉淀峰的高度。用标准样品峰高与 HSA 对应浓度关系制作标准曲线。根据标准曲线求算待测样品的 HSA 含量。

4、中空纤维柱浓缩 将 2L 诱导发酵液用孔径（MWCO）50000 道尔顿的中空纤维柱浓缩到 0.2L。Folin-酚法和火箭电泳测量前后总蛋白及 HSA 含量，结果经由中空纤维柱处理，可有效浓缩发酵液，HSA 含量为 1.33mg/ml。回收率 $\geq 95\%$ 。

5、脱色 100ml 浓缩发酵液加热至 50℃后搅拌下添加 3.0 克活性炭。继续搅拌 10 分钟。过滤除去活性炭，得到除去色泽的浓缩液。

6、Phenyl-Sepharose 疏水柱分离 中空纤维柱浓缩液 100ml 中加入固体硫酸铵到 20% 终浓度。HSA/(NH₄)₂SO₄ 溶液流入硫酸铵平衡的 Phenyl-Sepharose 柱，上样后用 2 倍体积平衡液洗脱，流出液中不再有蛋白时改用双蒸水洗脱，收集用双蒸水洗脱 HSA。含量分析表明，经 Phenyl-Sepharose 处理 HSA 纯化近 10 倍，回收率超过 90%。

7、免疫亲和层析纯化 疏水层析纯化 HSA 峰 20ml 对 0.01mol/L、pH7.2 磷酸缓冲液（含 0.9%氯化钠）透析。无 HSA 发酵液的抗体 - Sepharose 4B 亲和柱依序以 0.1mol/L pH2.6 的 Gly-HCl 缓冲液 - 3mol/L 硫氰酸钾、0.01mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液 - 0.9%氯化钠洗涤。上述透析平衡的 HSA 溶液（约 25ml）进入 HSA 亲和柱，用透析液洗涤出单一 HSA 峰。此 HSA 溶液 SDS-PAGE 电泳中银染呈现一条带。亲和柱先后用 0.1mol/L pH2.6Gly-HCl 缓冲液 - 3mol/L 硫氰酸钾、0.01mol/L pH7.2 磷酸缓冲液 - 0.9%氯化钠洗涤再生。HSA 回收率 98%

8、超滤脱盐 亲和层析漏出蛋白峰（约 30ml）经 MWCO 为 10000 道尔顿的小型超滤器脱盐。HSA 回收率 $\geq 95\%$ 。

9、真空冷冻干燥 将脱盐后的 HSA 溶液真空冷冻干燥得到 HSA 样品。

98.05.07

181: TTT GCT AAA AGG TAT AAA GGC GCT TTT ACA GAA TGT TUC CAA GCT
 phe ala lys arg tyr lys ala ala phe thr glu cys cys gln ala

 196: OCT GAT AAA OCT GGC TUC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT GCG
 ala asp lys ala ala cys leu leu pro lys leu asp glu leu arg

 211: GAT GAA GCG AAG GTT TUG TCT GGC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GGC
 asp glu gly lys ala ser ser ala lys gln arg leu lys cys ala

 226: AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TUG CCA GTA
 ser leu gln lys phe gly glu arg ala phe lys ala thr ala val

 241: GCT GTC CTG AGC CAG AGA TTC GGC AAA GCT GAG TTT CCA GAA GTT
 ala arg leu ser gln arg phe pro lys ala glu phe ala glu val

 256: TGC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TUC
 ser lys leu val thr asp leu thr lys val his thr glu cys cys

 271: CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC ACG GCG GAC CTT GGC
 his gly asp leu leu glu cys ala asp asp arg ala asp leu ala

 286: AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAA GAT TUG ATC TUC AGT AAA CTG AAG
 lys tyr ile cys glu asn gln asp ser ile ser ser lys leu lys

 301: GAG TGC TGT GAA AAA GCT CTG TIG GAA AAA TGC CAC TGC ATT GGC
 glu cys cys glu lys pro leu leu glu lys ser his cys ile ala

 316: GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG GCT GCT GAC TTG GCT TCA TTA GCT
 glu val glu asn asp glu met pro ala asp leu pro ser leu ala

 331: OCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TUC AAA AAC TAT OCT GAG
 ala asp phe val glu ser lys asp val cys lys asn tyr ala glu

 346: GCA AAG GAT GTC TTC TTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT CCA AGA
 ala lys asp val phe leu gly met phe leu tyr glu tyr ala arg

 361: ACG CAT GCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCT AAG
 arg his pro asp tyr ser val val leu leu leu arg leu ala lys

 376: ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAA AAG TUC TGT GGC OCT GCA GAT GCT
 thr tyr glu thr thr leu glu lys cys cys ala ala ala asp pro

 391: CAT GAA TUC TAT GGC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA GCT CTT GTG
 his glu cys tyr ala lys val phe asp glu phe lys pro leu val

图1 续

98.05.27

406: GAA GAG CCG CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG
 glu glu pro gln asn leu ile lys gln asn cys glu leu phe glu

 421: CAG CTT CGA GAG TAC AAA TTC CAG AAT CTG CTA TTA GTT CTT TAC
 gln leu gly glu tyr lys phe gln asn ala leu leu val arg tyr

 436: ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC
 thr lys lys val pro gln val ser thr pro thr leu val glu val

 451: TCA AGA AAC CTA CGA AAA GTG CCC ACG AAA TGT TGT AAA CAT CCT
 ser arg asn leu gly lys val gly ser lys cys cys lys his pro

 466: GAA CCA AAA AGA ATG CCC TGT CCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC
 glu ala lys arg met pro cys ala glu asp tyr leu ser val val

 481: CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC
 leu asn gln leu cys val leu his glu lys thr pro val ser asp

 496: AGA GTC ACC AAA TCC TCC ACA GAA TCC TTG GTG AAC ACG CGA CCA
 arg val thr lys cys cys thr glu ser leu val asn arg arg pro

 511: TCC TTT TCA CCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG
 cys phe ser ala leu glu val asp glu thr tyr val pro lys glu

 526: TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT CCA GAT ATA TCC ACA CTT
 phe asn ala glu thr phe thr phe his ala asp ile cys thr leu

 541: TCT GAG AAG GAG ACA CAA ATC AAG AAA CAA ACT CCA CTT GTT GAG
 ser glu lys glu arg gln ile lys lys gln thr ala leu val glu

 556: CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA CCT
 leu val lys his lys pro lys ala thr lys glu gln leu lys ala

 571: GTT ATG GAT GAT TTC CCA CCT TTT GTA GAG AAG TCC TCC AAG CCT
 val met asp asp phe ala ala phe val glu lys cys cys lys ala

 586: GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GGC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT
 asp asp lys glu thr cys phe ala glu glu gly lys lys leu val

 601: GCT CCA AGT CAA GCT GCT TTA GGC TTA TAA
 ala ala ser glu ala ala leu gly leu

图1 续

98.05.27

5' GGA TCC ACC ATG AAG TGG GTA ACC TTT ATT TCC CTT CTT TTT 3'
 met lys trp val thr phe ile ser leu leu phe
*Bam*H I Kozak seq.

图 2

5'--- GGC TTA GGC TTA TAA GAA TTC CG--- 3'
 ala leu gly leu •
*Eco*R I

图 3

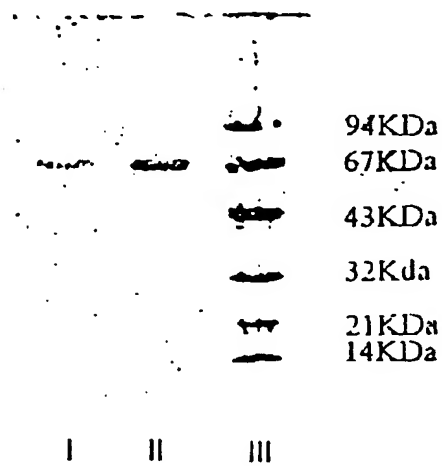


图 4

98.05.27

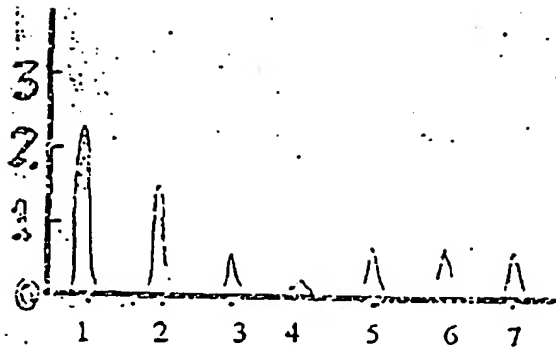


图 5

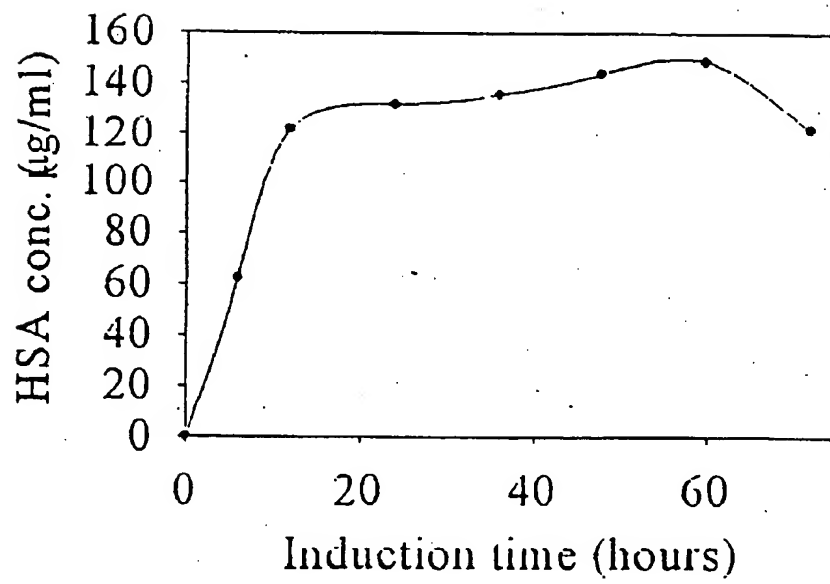


图 6

98.05.27

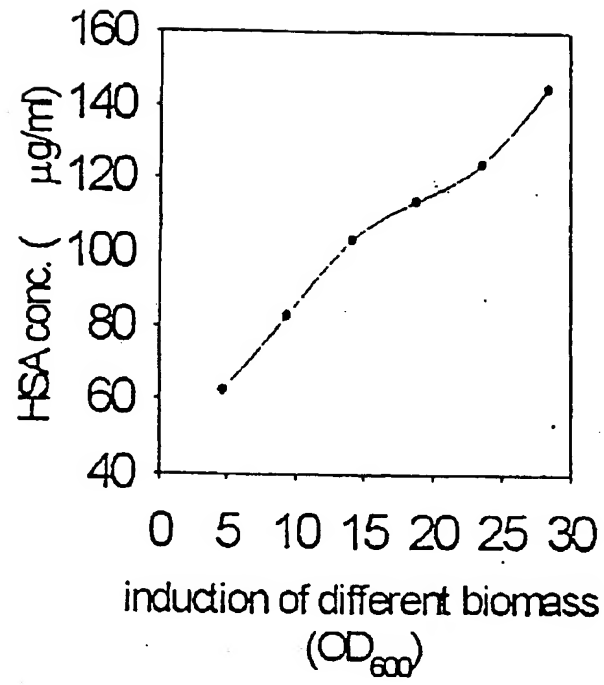


图 7

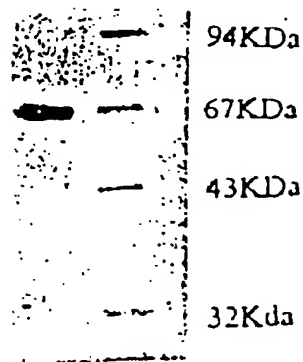


图 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.